

第6回森和英記念計算科学研究会

サルコメアレベルの筋収縮と筋肉の動き

新谷正嶺¹, 戸次直明¹, 石渡信一^{1,2}

1. 導 入

心臓の心筋細胞は生きている間、交換されていくものなのか、それとも一生涯変わらないのか、2009年、Bergmann らによって強い証拠が示された。冷戦時の核実験により生成され、人々の体内に取り込まれてしまった微量の¹⁴Cを建設的な研究のために有効活用してみせたことでも注目された研究であるので、ご存知の方も多いかもしれない。彼らは、取り込まれた¹⁴Cをヒト心筋細胞の置換の有無、有るならばその速度を計測する指標として活用し、心筋細胞の交換はほとんど起こらないが、全く起こらないわけではないことを示した[1]。その交換ペースは25歳で年1%, 75歳で年0.45%というものだった。つまり、1つの心筋細胞が、ヒトであれば何十年という期間、疲労することなく収縮運動を続けているということ、を、より強く確信できる知見にしてみせた。

この長く休まず収縮を続ける巧妙な仕組みはどのように生み出されているのだろうか。心筋細胞の収縮運動の源である最小要素は、タンパク質であるミオシンとアクチンの滑り運動的相互作用である[2]。ATPをADP+Piに変換する際に生じる化学エネルギーがミオシンとアクチンの滑り運動的相互作用という力学エネルギーに変換される。そのためミオシンは化学-力学エネルギー変換酵素とも呼ばれている。アクチンはミオシンが化学-力学エネルギー変換酵素として働くために必要な対となるタンパク質である。筋肉の中ではこの球体形状のアクチンの重合したフィラメントが、ミオシンの方向性を持ったすべり運動的相互作用を可能にするレールとなっている。このミオシンとアクチンについて調べることは、心筋細胞に備わった強靱な収縮メカニズムを調べる上で重要であろう。しかし、このアクチン、ミオシンは数nmスケールの物体で、その力発生の相互作用も確率的である。生きた心筋細胞内で筋収縮系を構成しているアクチン、ミオシン1つ1つの相互作用を観察することは困難であり、成功例は未だに無い。

心筋が属する横紋筋の中で、収縮力を発揮する動力源として働くミオシンとアクチンは、結晶のような密で規則正しい配列をしている。この配列は μm レベルの周期性を持っており、明視野の顕微鏡観察などをすると、明るい部分と暗い部分が周期的に繰り返された横紋構造が観察される。この横紋の一区切りが、長軸方向に長さ約 $2\mu\text{m}$ 、体積約 $1\mu\text{m}^3$ のサルコメアと呼ばれる収縮ユニットである。このサルコメアは、ミオシンの集まった太いフィラメントの束とアクチンで出来た細いフィラメントの束が部分的に重なり合い、しかし完全には重なり合えない形になっており、その重なり合った部分がミオシンのすべり運動的相互作用で変化する。前段で「生きた心筋細胞内で筋収縮系を構成しているアクチン、ミオシン1つ1つの相互作用を観察することは困難」と記述したが、その理由の主要因は、サルコメア内部のアクチンとミオシンの密度である。この約 $1\mu\text{m}^3$ の体積のサルコメアの内部に、約10万個のミオシンが配列している。生きた心筋細胞内という条件を除いても、この数と密度から、ミオシン単体の動態計測は困難

¹⁾ 早稲田大学 理工学術院 先進理工学研究科 物理学及応用物理学専攻

²⁾ 早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所 (WABIOS)

であり、さらに細胞内という条件がつくと、より制限が増してしまう。しかし、見方を変えると、それほどまで密に、規則的にミオシンが並んでいるため、正確なサルコメアの動きを計測し、内部のミオシンの状態に関しては、統計的に平均化されたものを考えるとするならば、直接ミオシンの動態を観察したわけではないものの、その推察をすることまでできる、確かな実験計測系が出来るとも捉えられる。

ミオシンには、伸びるときと縮まされる時で硬さが違うという非線形特性があることなど、単純加算では説明できない奥の深い性質が報告されている[3]。これらの主張が正しいのであれば、ミオシン等が集まって出来たサルコメアの動きも線形的な、ミオシン一つの振る舞いを単純加算して理解出来るようなものではないと考えられる。そうならば、前段で述べた様な正確なサルコメアの動きから内部のミオシンの動態を計測することはそう簡単には行えない。平均のミオシン動態と実際のミオシン動態がずいぶん異なる可能性が示唆される。しかし、どちらにせよ、サルコメアの正確な動態を計測すること、その結果とミオシンの振る舞いの関係を検証することが重要であるということに変わりはない。心筋細胞と、心臓の動きの関係を調べる上でも、サルコメアの動きは階層の異なる理解を繋ぐ橋渡しの役割を果たすだろう。

ゆえに我々は、AcGFP と α -アクチニンの融合タンパク質をラット幼若心筋細胞に発現させることで、サルコメアを仕切る Z 線を可視化し、nm 精度のサルコメアの動きと伴う同時刻での $[Ca^{2+}]_i$ を可視化させた実験系を構築した[4]。

2. 実験方法

生後 1 日齢のラットから単離心筋細胞を採集した[4]。簡単に説明すると、ラットから心臓を摘出し、PBS(+)の中で心臓内部の血を吐き出させる。その後、PBS(+)から Ca^{2+} と Mg^{2+} を除いた PBS(-)の溶液の中で心室部分の心臓切片を細かくチョッピングする。懸濁液を遠沈管に移し、溶液内の心臓細片が自然沈降してから上澄を捨て、コラゲナーゼ入り PBS(-)溶液に加えて懸濁する。この溶液を 37 °C でインキュベーションすることによって心臓切片から単離心筋細胞が溶出してくる。単離してきた心筋細胞が含まれる溶液を回収し、血清入りの D-MEM を加えることによってコラゲナーゼの酵素活性を失活させる。その後、遠心分離によって細胞ペレットを作成し、その上澄となるコラゲナーゼ入り溶液を捨て、新たに D-MEM を加えて懸濁状態とする。

ここで、単離心筋細胞の採集には成功しているのだが、心筋細胞の数以上の繊維芽細胞も一緒に含まれている。心臓を構成する細胞は、割合としては心筋細胞よりも繊維芽細胞の方が多いためである。以降の実験においても、この多数存在する繊維芽細胞をそのまま残しておくと、心筋細胞がほとんど細胞分裂を行わないのに対し、繊維芽細胞は倍々で増えていくため、心筋細胞の観測と環境条件の維持が困難になる。そこで、心筋細胞と繊維芽細胞を分離させる必要がある。一番簡単な方法は、懸濁液をシャーレに撒き、30分後に上澄を回収するという方法である。これは、繊維芽細胞と心筋細胞がシャーレの底に接着するまでの時間が異なることを利用した分離方法である。しかし、この方法は簡便ではあるが、細胞分離の精度は決して高くない。我々は、密度勾配遠心分離の方法で心筋細胞と繊維芽細胞を分離した。粘性の高いパーコール液を加える割合を調整した 2 種類の PBS(+)的成分の溶液、もっと詳しく言うと、繊維芽細胞よりも密度が高いが、心筋細胞よりは密度が低い溶液と心筋細胞よりも密度の高い溶液を作り、その 2 液の層が出来た遠沈管の上に細胞懸濁液を加え、遠心分離を行った。こうすることで、細胞塊や血球は遠沈管の最下段に集まり、繊維芽細胞はこの粘性溶液の溶液内に入り込めない為に密度の低い方の

溶液の上に留まる。そして、間の2種の粘性溶液相の間に心筋細胞が集まる。これを回収することで、純度の高い単離心筋細胞を回収することが出来る。

前段の方法で採集したラット初代培養幼若心筋細胞に α -actinin-AcGFP のプラスミドをリポフェクションし、Z 線に AcGFP を発現させた。 α -actinin と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させると、Z 線の可視化が出来ることは、ニワトリや同じく新生児ラットの心筋細胞において示されている[5,6]。この Z 線を蛍光観察可能にした心筋細胞に対して、nanometry の方法を適応し、顕微鏡の光学的分解能や計測に用いたカメラの画素のサイズを超えた、高精度のサルコメア計測を試みた。

3. 結 果

青励起、緑色蛍光の1波長1励起の蛍光顕微観察で、図1.Aに示すような横紋様に光る蛍光像を取得できる。この光る輝線一つ一つがサルコメアを仕切るZ線であり、その間の相対的な距離がサルコメア

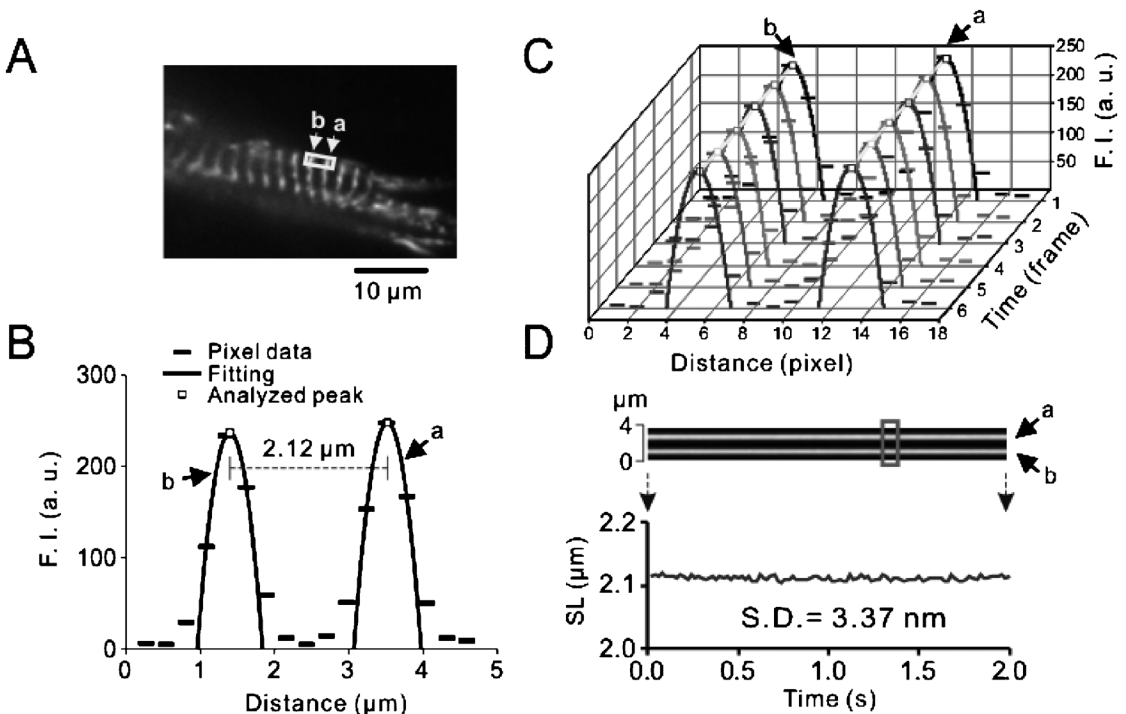


図1 SL nanometry のための輝度ピーク位置検出と計測結果 ([4]より引用)

- (A) Z 線に α -actinin-AcGFP を発現させた幼若心筋細胞の蛍光像。黄枠で囲った部分の輝度分布を用いて(B)の解析を行った。黄枠内の Z 線に相当する 2 本の輝線をそれぞれ a, b とラベルした。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が 10^{-9} M のサルコメアが弛緩する溶液条件で観察を行った。
- (B) 画像解析による輝度中心位置推定の結果。(A)の黄枠領域の輝度情報から得た 1 次元輝度情報が Pixel data。輝線を捉えた数 Pixel のうち、最も輝度の値が高い Pixel とその隣接 Pixel の輝度情報から fitting 関数を作成し、そのピークの値を推定輝度中心位置とした。
- (C) (B)で示した解析を、取得した動画の frame ごとに行った結果。奥の黒色のデータは(B)と同じデータで、その後 5 frame 分の同一輝線の解析結果を示している。動画撮影時の frame rate は 50 fps。
- (D) 100 frame 分、(B)と同一の 2 輝線の中心位置推定を行い、その 2 輝線 (Z 線)の相対距離であるサルコメア長の時間発展を求めた結果。上方にあるのが輝線のカイモグラフで下方にあるのがサルコメア長変化の解析結果。静止条件のサルコメア長を計測しており、SD が計測精度を反映した指標となる。

長 (SL) となる。電子顕微鏡で調べた Z 線の厚みはおおよそ 8 nm 程度であるのに、サブ μm くらいの厚みのある蛍光に見えるのは、蛍光観察の光学的分解能による。そのサルコメアの長軸方向 (収縮する方向) の輝度分布は図 1.B のようになる。この輝度情報は、離散的な値となるのだが、近傍の pixel を含めた複数の pixel から輝度ピークの中心位置を推定すると、その推定値は pixel サイズよりも遥かに高いレベルで推定することが出来る。ここで、各 pixel の輝度の値が大きいほど、カメラの精度として光子を漏らさず捉えられているほど、推定した位置の精度が高くなる。図 1.C に示すように、この中心位置推定を動画の各 frame ごとに行うと、SL の時間発展の計測が可能になる (図 1.D)。静止サルコメアの長さ変化を計測した場合の値の SD は、明るいサルコメアに対しては 3 nm という値も得ることが出来る。つまり、この SD の 2 倍の 6 nm を超える変位があったと計測できた場合、95% の確率でそれがノイズではなく本当にサルコメアが動いたのだと判断できる。

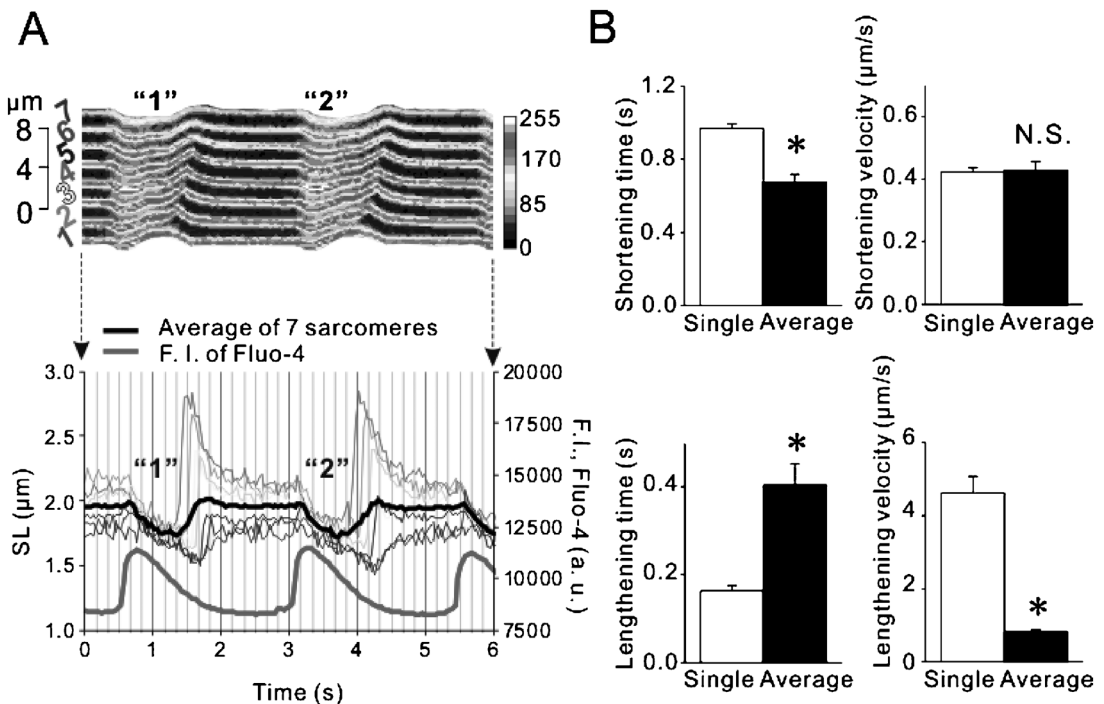


図2 興奮収縮連関時の個々のサルコメアの挙動と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化 ([4]より引用)

- (A) 自発拍動をする心筋細胞の7つのサルコメアと細胞質 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の時間発展のカイモグラフとそこから解析できる時間発展のグラフを示す。上方のカイモグラフが示すように、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高くなると全体的な輝度が上がり、間隔をある程度保った輝線集団の変位が発生する。全体的な輝度が下がると元の輝線配置に戻るが、その際、下方の1番目のサルコメアから上方の7番目のサルコメアまで、シャープな位置変化の波が見える。下方のグラフに示す、この輝線間隔から計測されるサルコメア長変化は、平均のサルコメア長変化 (黒太線) とは大きく異なっていることが分かる。同時に収縮する一方で、弛緩のタイミングが大きくずれている。早めに弛緩したサルコメアは大きな振幅の過伸長を伴った弛緩を行い、遅く弛緩したサルコメアは過伸長を行わない。この弛緩のタイミングのズレのために、平均のサルコメア長変化では振幅の過伸長がみられず、また、平均の弛緩時間が長い。
- (B) 収縮時間、収縮速度、弛緩時間、弛緩速度の値について、個別のサルコメア長変化を計測してからその平均を取った値と初めから平均のサルコメア長変化を計測した場合の値を比較した結果を示す。左上が収縮時間、右上が収縮速度、左下が弛緩時間、右下が弛緩速度の比較の結果となる。収縮速度のみ、どちらの計測方法で得られた値も統計的有意差のない同等の値となったが、他の振動特性の値は全く異なる値となってしまうことが示された。データは連続6回の拍動における7つのサルコメアの値から取得した。棒グラフのエラーバーはS.E.である。

次にこの実験系を用いて自発拍動をする心筋細胞の、その時のサルコメア長変化を解析した。すると、図2に示す結果となった。まず、各サルコメアが $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に反応して収縮する (phase 1)。続いて、素早く伸展する (phase 2)。そして、元のSLにまで収縮して戻る (phase 3)。筋細胞内の全てのサルコメアが $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に応じた phase 1 の収縮運動をする一方、phase 2 (およびそれに続く phase 3) は時間依存かつSL依存で、 $[Ca^{2+}]_i$ 独立に生じていた。図2Aに示すように、隣接連続サルコメアで、弛緩のタイミングがズレている。我々の解析は、平均SLの計測では、隣接連続サルコメアの伸展のタイミングがズレているのに同じタイミングで弛緩をしているとみなして加算平均をしているために、サルコメアの伸展速度を本来よりもだいぶ低い速度に過小評価してしまうことを明らかにした。この平均値と個別の値における、SL変化の収縮・伸展特性と振幅の違いを棒グラフ図2Bで示した。まず、平均値の場合には、個別の値を求めた場合の、値のバラつきや分散の情報が消える。そのため、個別の値を求めた後にそこから計算する平均値と、平均SLの値は異なることがはっきりと分かる。

4. ま と め

我々は、高精度にサルコメア長を計測できる蛍光観察の実験系を構築した。そして、この実験系で自発拍動する心筋細胞の内部のサルコメア動態を計測した結果、個別のサルコメアの振る舞いと平均のサルコメアの振る舞いが大きく異なることを発見した。すなわち、収縮方向に沿った複数サルコメアの平均の長さは、異なるタイミングで弛緩した連続サルコメア集団を重ね合わせてしまうために、サルコメアの伸展速度をかなり過小評価してしまうことを見出した。これは、個別のサルコメアを計測する必要性を端的に示す一例になっているのではないだろうか。我々はこの実験系とこの実験系を用いた電気刺激に応答するサルコメアの収縮動態や、細胞内を高い一定 $[Ca^{2+}]_i$ にすると発生するサルコメアの自励振動収縮状態 (cell-SPOC) などの計測結果をJGPにて報告している[4]。他にも、様々なサルコメアレベルの筋肉の研究に、本実験系を活用できると考えている。

謝辞

最後に、本研究の遂行にあたり、ご指導、ご助言を下さいました東京慈恵会医科大学の福田紀男准教授に感謝を申し上げます。

参 考 文 献

- [1] Berqmann O, Bhardwai RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinqe S, Frisen J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 324: 98-102.
- [2] Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibers. 1954. *Nature*. 22: 971-973.
- [3] Kaya M, Higuchi H. 2010. Nonlinear elasticity and an 8-nm working stroke of single myosin molecules in myofilaments. *Science*. 329: 686-689.
- [4] Shintani SA, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Ohki T, Ishiwata S, Fukuda N. 2014. Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with α -actinin-AcGFP in Z discs. *J Gen Physiol* 143: 513-524.
- [5] Dabiri GA, Turnacioglu KK, Sanger JM, Sanger JW. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 9493-9498.
- [6] Hersch N, Wolters B, Dreissen G, Springer R, Kirchgeßner N, Merkel R, Hoffmann B. The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biol Open*. 2013; 2: 351-361.